

062,918
APPLICANT

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-215534

⑬ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和62年(1987)9月22日

A 61 K 39/395

7252-4C

A 23 K 1/16

3 0 4

Z-6754-2B

1/18

D-6754-2B

C 07 K

3/26

15/06

8318-4H 審査請求 未請求 発明の数 3 (全7頁)

⑮ 発明の名称 鶏卵からの特異的抗体含有材料およびその製造方法と用途

⑯ 特 願 昭61-218859

⑰ 出 願 昭61(1986)9月17日

優先権主張 ⑱ 昭60(1985)11月25日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 昭60-264108

㉑ 発 明 者 所 秀 雄 岐阜市折立296番地の1 フォーベスト有限会社内

㉒ 出 願 人 フォーベスト有限会社 岐阜市折立296番地の1

㉓ 代 理 人 弁理士 広瀬 章一

明 細 書

1. 発明の名称

鶏卵からの特異的抗体含有材料およびその製造方法と用途

2. 特許請求の範囲

(1) 予め抗原を接種した鶏が産生した卵の全卵、卵黄もしくは卵白から得た、該抗原に特異的な抗体を含有する特異的抗体含有材料。

(2) 前記卵の全卵もしくは卵黄をそのまま回収して得た、特許請求の範囲第1項記載の特異的抗体含有材料。

(3) 前記卵の全卵、卵黄もしくは卵白から分子量10,000以下のものを分離回収して得た、特許請求の範囲第1項記載の特異的抗体含有材料。

(4) 前記抗原が、花粉、細菌、ウイルス、カビ、アレルギー、罹患動物の血液、精子および毒素よりなる群から選ばれる、特許請求の範囲第1項ないし第3項のいずれかに記載の特異的抗体含有材料。

(5) 前記抗原が不活化、弱毒化もしくはサブユニ

ット抗原である、特許請求の範囲第1項ないし第3項のいずれかに記載の特異的抗体含有材料。

(6) 鶏に抗原を接種し、該抗原に特異的な抗体を鶏の体内に形成させること、

前記抗体が卵子内に形成されてから該鶏が産生した鶏卵を採取すること、および

該鶏卵の前記抗体を含有する全卵、卵黄もしくは卵白から前記抗体を含有する物質を回収すること、

からなる、鶏卵からの特異的抗体含有材料の製造方法。

(7) 前記卵の全卵もしくは卵黄をそのまま回収して得た、特許請求の範囲第6項記載の特異的抗体含有材料。

(8) 前記卵の全卵、卵黄もしくは卵白から分子量10,000以下のものを分離回収して得た、特許請求の範囲第6項記載の特異的抗体含有材料。

(9) 前記鶏卵から前記抗体を分離回収するに際し、全卵、卵黄もしくは卵白液を、エマルジョン状になるまで攪拌し、次いで酸処理と中和あるいは有

機溶媒処理を行った後、遠心分離し、得られた上清を抗体含有画分を分離するように限外口過する、特許請求の範囲第8項記載の方法。

(10)前記限外口過が、分子量約10,000を超える抗体成分を除去するものである、特許請求の範囲第9項記載の方法。

(11)前記抗原が、花粉、細菌、ウイルス、カビ、アレルギー、罹患動物の血液、精子および毒素よりなる群から選ばれる、特許請求の範囲第6項ないし第10項のいずれかに記載の方法。

(12)前記抗原が不活化、弱毒化もしくはサブユニット抗原である、特許請求の範囲第6項ないし第10項のいずれかに記載の方法。

(13)予め抗原を接種した鶏が産生した卵の全卵、卵黄もしくは卵白から得た、該抗原に特異的な抗体を含有する特異的抗体含有材料からなる、飼料用添加物。

(14)前記特異的抗体含有材料が、全卵もしくは卵黄をそのまま回収して得たものである、特許請求の範囲第13項記載の飼料用添加物。

造のフードファクターを含んだ生成物が得られることが開示されている。この方法によれば、抗原物質としては、花粉、細菌、ウイルス、カビ、アレルギー、精子および毒素が使用できる。有効成分として上記のフードファクターを含有する生成物は、栄養補給剤として有用である。

また、一般にこのような抗体含有生成物を動物に摂取させると、その生成物の製造に使用した前記抗原と同じ抗原に対する攻撃からこの動物を防護するのに効果を発揮することも認められている。しかしながら、上記米国特許の場合、感染防御に重要な抗体成分は上記限外口過法により完全に除去されてしまっていると考えられる。

さらに、上記方法では分娩直後の牛に抗原を投与しなければならず、また採取対象も初乳を必須成分として含むが、これは分泌期間が分娩後数日間と極めて限られているため、大量に生産しようとするとは非常に大規模な農場を確保することが必要となり、我が国において上記方法を継続して適用することは一般に困難である。

(15)前記特異的抗体含有材料が、全卵、卵黄もしくは卵白から分子量10,000以下のものを分離回収して得たものである、特許請求の範囲第13項記載の飼料用添加物。

(16)前記抗原が不活化、弱毒化もしくはサブユニット抗原である、特許請求の範囲第13項ないし第15項のいずれかに記載の飼料用添加物。

3.発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、鶏卵を利用して、各種抗原から選んだ特定の抗原に特異的な抗体を含有する材料を製造する方法、ならびにその抗体含有材料およびその用途に関する。

(従来の技術)

米国特許第4,402,938号には、分娩前の牛その他の有蹄類動物の乳房に抗原物質を接種し、分娩後に初乳およびその後の乳を採取し、これらから脂肪分と固形分を除去して乳清を得、この乳清を0.2 μm 以下の孔径のフィルターで限外口過することにより、ロ液として分子量1200以下の未知構

また、上述の米国特許においては、乳清からの有効成分の分離を0.2 μm のフィルターで行っているため、生成物としてのフードファクターの他に、B溶解素、コングルチニン、インターフェロン、ラクトフェリン、ラクトペルオキシダーゼ、Bリンパ球、リゾチーム、マクロファージ、ポリペプチド、プロペリドン、チオシアネートなどを含有するとされているが、これより分子量の大きい、抗体分子などの乳中の有用成分が生成物から完全に除かれてしまっている。したがって、製造過程において牛に抗原物質を投与しているにもかかわらず、その抗原に特異的な抗体の一部が生成物に含まれずに利用されないままになっている。

さらに、上記米国特許の方法は、初乳とその後の乳を別々に処理し、固形分の分離のために数10日の凍結を必要とするなど操作も煩雑である。

(発明が解決しようとする問題点)

豚、鶏等の家畜類の疾病のうち多くのものが抗体投与によって感染防御が行い得ることは公知であり、そのため多くの抗体含有材料の製造方法が

提案されているが、例えば前述の米国特許の方法のようにいずれも大量に製造することはできず、高価なものとなっている。

その他、抗体含有材料は、家畜用飼料、化粧品、医薬品等への添加物として、さらには血清学的診断などの用途にとっても有用であり、その大量で安価な供給が要望されているところである。

したがって、本発明の目的は、ある抗原に対する抗体を含有する材料を大量に供給できる安価な方法を提供することである。

さらに、本発明の別の目的とするところは、大量かつ安価に供給できるそのような抗体含有材料およびそれからなる家畜用飼料、化粧品、医薬品等への各種添加物を提供することである。

(問題点を解決するための手段)

本発明者は、かかる目的を達成すべく、上記米国特許の方法に基き、抗体生成物の製造を大量にしかも時期を選ばずにいつでも実施できるように手段を開発するため鋭意検討を重ねた。しかし、牛を使用すると上述した制約を避けることができ

ないため、鶏の利用に着目して実験を重ねたところ、鶏の利用によって効率的にしかも時期を選ばずに接種した抗原に対応する抗体が生産され、この抗体を含む各種用途に有用な材料を得ることができることを知り、本発明を完成した。

ここに、本発明の要旨とするところは、予め抗原を接種した鶏が産生した卵の全卵、卵黄もしくは卵白から、該抗原に特異的な抗体を回収することにより得た、特異的抗体含有材料である。

本発明は、また、鶏に抗原を接種し、該抗原に特異的な抗体を鶏の体内に形成させること；前記抗体が卵内に形成されてから該鶏が産生した鶏卵を採取すること；および該鶏卵の前記抗体を含有する全卵、卵黄もしくは卵白から、例えば酸処理などの適宜処理によって前記抗体を分離回収することからなる方法である。

なお、前記抗体含有材料の利用形態としては、前記卵の全卵もしくは卵黄をそのまま回収して利用する場合と、前記卵の全卵、卵黄もしくは卵白から分子量10,000以下のものを分離回収して利用

する場合とがある。前者の場合、特に、腸管感染症の予防治療用として有用であり、後者の場合、分子量10,000以下の区画分にはTF(トランスファクター)等が含有されているため、感染症の治療用として使用するのが特に好ましい。残りの分子量10,000超の区分には抗体の実質的部分が含有されるため、特異的抗体含有材料としてそのまゝ別途利用できる。

本発明の好適態様にあつては、前記抗原として、花粉、細菌、ウイルス、カビ、アレルゲン、罹患動物の血液、精子および毒素よりなる群から、生成物の使用目的に応じて適宜選んだものを使用できる。

本発明の抗体含有材料を飼料用添加物に使用する場合、抗原が不活化、弱毒化もしくはサブユニット抗原であるのが特に好ましく、得られた生成物は、使用した抗原に対応した抗体を含有しているので、これを動物に摂取させると、感染予防治療効果が発揮される。

本発明の抗体含有材料はまた、前記特異的抗体

のほかに、米国特許第4,402,938号に記載のフードファクターも含有していると考えられ、したがって、この米国特許に記載の栄養補給および感染予防効果も本発明の抗体含有材料により得られよう。

なお、本発明にあつて、特異的抗体は分子量10,000で区分すると前述の分子量10,000以下の区分には実質的含有されないが、便宜上この区分も抗体含有材料と称する。後述するところから明らかのように、この分子量10,000以下の区分は上記フードファクターに相当するものである。

(作用)

本発明の抗体含有材料の製造方法の例を具体的に次に説明する。ただし、本発明の精神から離れることなく、この方法の各種の変更法あるいは別法も考えられるが、それらはいずれも本発明の範囲内である。

まず、豚、牛などの幼若動物に発生する大腸菌症、特に下痢症の病原因子である例えばブタETEC 987P、K88、K99抗原などの適宜の抗原を、所

望により免疫増強剤(アジュバント)と共に鶏に接種する。この接種は皮下注射あるいは腹腔内投与などの適宜の経路で可能である。抗原の接種量は、使用抗原の種類及び免疫増強剤の種類に応じて所望の抗体が体内に適量形成され、過度の毒性が発揮されないよう選択する。これらの選択は実験により適宜行うことができる。通常は、抗原の投与から数週間以内に該鶏の体内に投与した抗原に特異的な抗体が形成され、その鶏が産生する卵にこの抗体が含まれるようになる。高力価の抗体が持続するように適当な間隔(通常、最低2~4週間)で同じ抗原を追加接種することもできる。卵における抗体の含有は、既知の検査法により確認することができる。

このようにして抗体が卵に含有されるようになった後、その鶏が産生する卵を採取する。同種の抗体を含有する卵が適量集まったところで、本発明の方法により抗体含有材料を製造する。

まず、全卵(あるいは抗体の種類によっては卵黄もしくは卵白のみ)を取り出し、攪拌すること

径をもった限外口過フィルター(孔径=0.45 μ m)により限外口過して、フードファクターを含有する画分を捕集することができる。この限外口過フィルターの孔径を選択することによって、ウイルス、マイコプラズマ、細菌などを有効に除去できる。すなわち、分子量およそ10,000超の抗体分子量は除去されるので、ウイルスや細菌は除かれ、フードファクターが主成分として液に残留する。以上の操作は、通常は室温よりあまり高くない温度以下、たとえば0~25℃程度の温度で行うのが好ましい。得られた生成物は、液状のままあるいは凍結乾燥などの適宜の手段により保存することができる。

かくして、本発明によれば、鶏を抗原接種対象動物にすることから、多数の個体に接種が可能であって、また常に卵を生産しているから定期的に何ら制限されず、簡便に生物体内の抗体産生反応を利用できるのである。また、多数の個体を利用できるので、本発明を多様な多くの抗原に容易に適用でき、さまざまな種類の異なる抗体含有材

料によって、エマルジョン状とする。場合によっては、水を加えて希釈する。次に、分子量10,000カットの限外口過フィルターを使用することによって、抗体成分とフードファクターを得る二つの工程に分かれる。

すなわち、抗体成分を得るためには抗体を含有する卵エマルジョンそれ自体または分子量10,000超の抗体成分のみを原料としてその抗体活性が破壊されないような方法、たとえば、スプレードライ法または凍結乾燥法により抗体を安定的に回収することができる。

一方、分子量10,000以下のフードファクターは次のようにして分離、回収することができる。たとえば1N塩酸を適当な酸性度(例: pH4.5程度)になるまで添加し、固形分を沈殿させる。沈殿物を高速遠心によって除去した後、アルカリ、たとえば1N NaOH水溶液で中和する。この酸性化と中和も適当な攪拌下で実施する。このような酸処理に代えて、有機溶媒で処理することもできる。次に、得られた上清を、分子量10,000カットの孔

料を計画的に同時に製造することができる。

しかも、本発明では、鶏卵を回収するだけでよいから、簡便であり、またその後の処理も著しく簡便かつ容易になる。

本発明の生成物、すなわち抗体含有材料(抗体成分および/またはフードファクター)は、各種の用途に有用であると期待され、たとえば、飼料用添加物、医薬品、化粧品、食品として利用できるよう。

次に、本発明をその実施例によってさらに詳細に説明するが、本発明はそれらによって特に制限されるものではない。

実施例

実験用鶏に抗原としてブタBTEC 987P 抗原を1羽につき約45 μ g皮下注射した。4週間後同量の同じ抗原をブースターとして再度注射した。この鶏の抗体定量試験(凝集反応)の結果、上記抗原に対する特異的な抗体の生成が確認されたので、その確認の日以降の鶏卵の採取を開始した。このときの初回免疫後日数と卵黄抗体価との関係を第1図に

第1表

ロット 番号	抗原 (定着因子)	37℃での保存月数				
		0	1	2	3	6
1	K88	128	128	128	128	128
	K99	128	128	128	128	128
	987P	256	256	256	256	256
2	K88	256	256	256	256	256
	K99	256	256	256	256	256
	987P	512	512	512	512	512
3	K88	512	512	512	512	512
	K99	512	512	512	512	512
	987P	512	512	512	512	512

グラフで示す。8週間で飽和値に達したことが分かる。

次いで、同様にして別の実験用鶏に抗原 K88、K99 を投与した。

得られた卵黄抗体の安定性を評価した。採取した鶏卵から卵黄のみを使い、これをスプレイドライ法によって粉末化し、この抗体粉末1gを9mlのPBSで溶解し等量のクロロホルムを加えて強く振とう後、3,000rpmで20分遠心分離処理をした上清を原液として凝集反応によって力価を測定した。結果は第1表にまとめて示す。いずれの抗原の場合も6ヶ月保存後でも抗体力価はほとんど変化しなかった。この抗体含有材料は飼料添加物、医薬品として特に有用である。

次に、ブクETEC 987P 抗原を投与した場合について、採取された鶏卵の全卵約5kgを攪拌して、卵エマルジョンとし、PBSで2倍に希釈し、ミキサーで15分間攪拌した。この希釈卵エマルジョンに1N HCl をpHが4.5 となる量で添加し、さらに15分間攪拌した後、析出した固形分を高速遠心により除去した。この上清を1N NaOH で中和処理をし

た後、孔径0.45μmの限外フィルターでろ過し、分子量10,000以下のものを分離回収した。このカット分には前記抗原に対する特異的なTF(トランスファクター)的物質が含有されていた。

次いで、本発明にかかる抗体含有材料の効果を確認するために、前述のようにして得られた抗体粉末を仔豚に経口的に投与した。

抗体投与群と対照群とに対し、それぞれ987P・ETEC攻撃後の体温の変化、臨床症状、そして攻撃菌の増殖状況をそれぞれ評価した。

結果は第2図および第2表ないし第4表にまとめて示す。

第2図からは、抗体投与群では、攻撃直後一旦体温が低下するが、およそ2日経過後直ぐに回復し、一方、対照群では体温の回復が数日遅れることが分かる。このときの臨床症状は第2表に便の状態によってまとめて示すように、抗体投与群では3日目では全く正常便となるが、対照群では死亡例も含めて5日経過後も回復していない。同様の傾向は第3表および第4表からも看取される。

第2表
987P⁺ETEC攻撃後の臨床症状

攻撃後 日数	抗体投与群			対 照 群						
	1(3)	2(3)	3(3)	4(3)	5(3)	6(3)	7(3)	8(3)	9(3)	10(3)
0(4)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3
2	1	1	1	3	3	3	4	3	3	3
3	0	0	0	3	4	3	・	2	3	3
4	0	0	0	3	・	3	・	2	3	2
5	0	0	0	2	・	2	・	2	2	2

症状の程度 0=正常便、1=軟便(形をとどめる)、2=軟便(形をとどめない)、3=水様便、4=死

第3表
仔猪糞便からの攻撃菌の分離

攻撃後 日数	抗体投与群					対照群				
	1(♂)	2(♀)	3(♀)	4(♂)	5(♂)	6(♂)	7(♀)	8(♂)	9(♀)	10(♂)
0(日)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

DHL 素天増地における攻撃菌コロニーの割合
 十＝約50%、十＝約80%、十＝約100%

第4表
仔猪小腸内容からの攻撃菌の分離

小腸部位	抗体投与群					対照群				
	1(♂)	2(♀)	3(♀)	4(♂)	5(♂)	6(♂)	7(♀)	8(♂)	9(♀)	10(♂)
十二指腸	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
空腸	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
回腸	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

DHL 素天増地における攻撃菌コロニーの割合
 十＝約50%、十＝約80%、十＝約100%
 * No.5と7は死亡時に、他は攻撃後5日目に材料採取。

(発明の効果)

すでに述べたところから明らかなように、本発明によれば、鶏を抗原接種対象動物にしてその産生する卵を採取するため、多量にかつ安価に抗体含有材料が製造でき、あるいは、場合によっては抗原を多種用意して各鶏にそれぞれ接種することにより多くの種類の抗体含有材料を少量だけ簡便かつ安価に製造できる。

したがって、かかる抗体含有材料の用途は飛躍的に拡大することが考えられる。

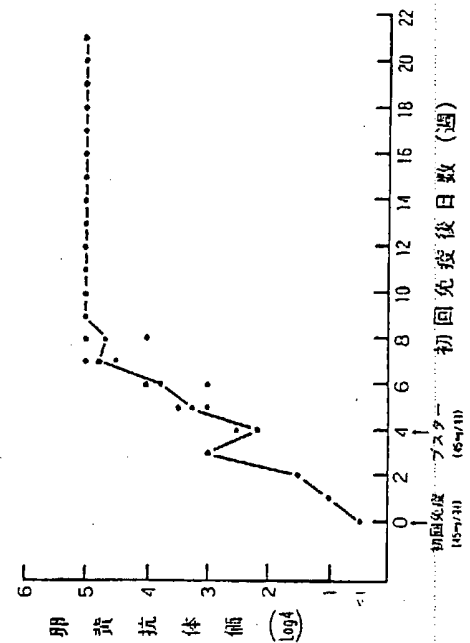
また、現在大きな問題になっている仔猪の大腸菌症である下痢症に対しても、本発明にかかる特異的抗体含有材料の投与によりほぼ完全に防御できることから、その実際上の利益には計り知れないものがある。

4.図面の簡単な説明

第1図は、免疫後日数と卵黄抗体価との関係を示すグラフ；および

第2図は、攻撃菌投与後の仔猪の体温の変化を示すグラフである。

第1図
採卵鶏にブタETEC 987P抗原を免疫した時の卵黄抗体価の推移



第 2 図
987P⁺ ETEC 攻撃後の体温

